

**Université Mohamed KHIDER Biskra**  
**Faculté des Sciences Exacte et des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Enzymologie Appliquée et Génie Enzymatique**  
**TD5 : Techniques de Purification**

**Exercice 1 :**

On détermine les temps de rétention ( $t_r$ ) au cours d'une chromatographie sur Sephadex, des protéines suivantes dont on connaît la masse moléculaire (MM) (Le débit de la colonne est de 5 ml / min) :

	MM	$t_r$ (min)
Aldolase	145000	10,4
Lactate déshydrogénase	135000	11,4
Phosphatase alcaline	80000	18,4
Ovalbumine	45000	26,2
Lactoglobuline	37100	28,6

1 - Calculer les volumes d'élution ( $V_e$ ) correspondants.

- Porter le log de MM en fonction de  $V_e$  - Que remarquez-vous ?

2 - Pour la glucokinase,  $t_r = 21$  min. Déterminer sa masse moléculaire à l'aide du graphique précédent.

**Exercice 2 :**

Un mélange d'immunoglobulines G (MM = 160000 Da) et d'albumine sérique bovine (MM = 67000 Da) est déposé sur colonne de séphadex G-100 (limite d'exclusion = 100000 Da).

Rappel : MM = masse moléculaire.

- Tracer un diagramme d'élution vraisemblable (DO en fonction de  $V_e$ ) en indiquant le volume mort.

**Exercice 3**

On veut déterminer la masse moléculaire (MM) d'une protéine p par chromatographie d'exclusion. La limite d'exclusion du gel se situe entre 40000 et 400000 de MM.

L'étalonnage du gel se fait par diverses substances, dont les MM (exprimées en Daltons) et les volumes d'élution ( $V_e$ , exprimé en ml) sont indiqués dans le tableau suivant :

	MM (Da)	$V_e$ (ml)
Dextran	2000000	45
Fibrinogène	340000	60
Catalase	230000	75

Lactoglobuline	19000	132
----------------	-------	-----

2 - La protéine *p* montre, quant à elle, un volume d'éluion  $V_e = 113$  ml. Déterminer sa MM.

**Question 1.**

Quelles sont les raisons d'utilisation de la précipitation au sulfate d'ammonium comme étape initiale de purification d'une protéine ?

**Question 2.**

Justifier le choix d'utilisation de tampons à pH supérieur à 6,0 mais inférieur à 10,0 lors de la chromatographie sur DEAE-cellulose de la 6-phosphogluconate déshydrogénase qui possède un pI de 6 (marge de pH permettant la fixation de l'enzyme)